

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Laboratorio de Neurobiología de la Audición
Dpto. de Biología Celular y Patología
Instituto de Neurociencias de Castilla y León
C/ Pintor Fernando Gallego nº 1. Salamanca

*“CAMBIOS EN EL COLÍCULO
INFERIOR DE LA RATA
TRAS ABLACIÓN CORTICAL
AUDITIVA UNILATERAL”*

Director: Dr. Miguel Ángel Merchán Cifuentes

Verónica Lamas Álvarez

SALAMANCA, 19-06-2009

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central auditivo de los mamíferos se organiza en estaciones: núcleos cocleares, complejo olivar superior, núcleos del lemnisco lateral, colículo inferior (CI), tálamo y cortezas primarias y secundarias (Brodal and Brodal, 1981) (Figura 1), en las cuales se elabora el mensaje sensorial. Este mensaje contiene las propiedades temporales, espectrales y de localización del sonido necesarias para el procesamiento auditivo y su integración con el mensaje procedente de otras vías (visual, somatosensorial, etc). Para desarrollar estas dos funciones, procesamiento auditivo e integración polisensorial, las diferentes estaciones de la vía auditiva se encuentran organizadas jerárquicamente en dos sistemas que se conocen como sistema lemniscal (nucleo-core) y sistema de integración polisensorial (cibiturón-belt).

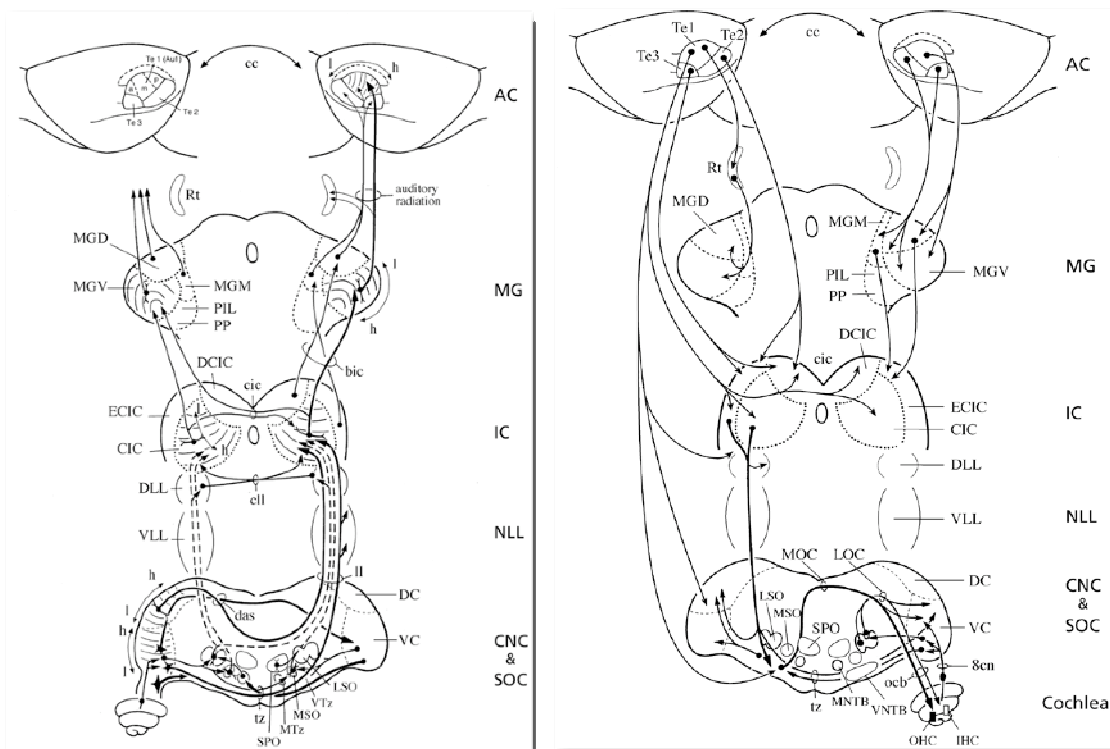


Figura. 1. Representación esquemática de las vías auditivas ascendente y descendente. Nótese que en el CI se produce la integración de señales de los núcleos subcoliculares y supracoliculares.

Mientras que en la vía auditiva baja las áreas del belt (núcleos periolivares, núcleos paralemniscales, sagulum, etc) se encuentran separadas de las zonas de procesamiento exclusivamente auditivo (LSO, MSO, núcleos del lemnisco lateral, etc.), en el CI estas áreas se encuentran organizadas de forma compacta y fuertemente conectadas entre sí por un sistema de conexiones intrínsecas y comisurales bien conocido (Saldaña and Merchan, 1992, Malmierca et al., 2003, Malmierca et al., 2005) (Figura 2). De modo

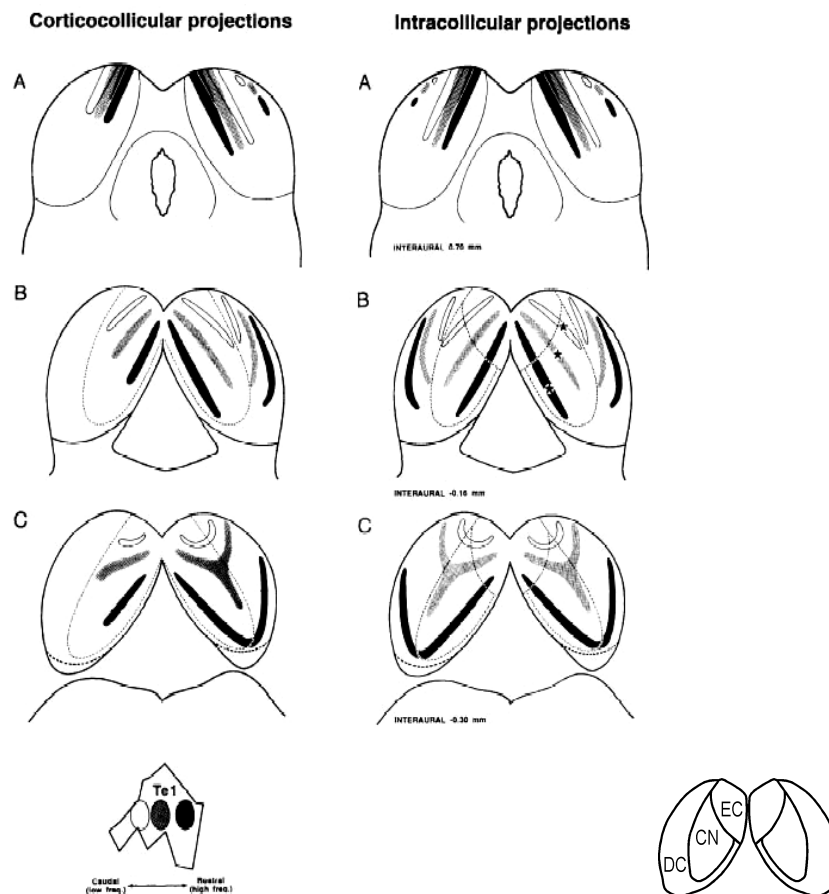


Figura 2. Columna izquierda. Representación esquemática de la distribución de los campos terminales corticocoliculares. El inset corresponde al sitio de inyección: negro→ región de altas frecuencias, rostral, Te1. Gris→ región de frecuencias medias, medial caudal. Blanco→ región de bajas frecuencias, muy caudal (Saldaña et al., 1996).

Columna derecha. Diagrama de la distribución de los campos terminales intracollicular, con sitios de inyección (estrellas) localizadas en regiones de alta (negro), media (gris) y bajas (blanco) frecuencias del NC (Saldaña y Merchán, 1992). El inset corresponde a las tres subdivisiones del CI: corteza dorsal (DC), corteza externa (EC) y núcleo central (CN).

que el *core* en el colículo se corresponde con su núcleo central (CN) mientras que el *belt* está organizado en dos subdivisiones pericentrales conocidas como corteza dorsal (DC) y corteza externa (EC) (Figura 2).

En sentido descendente, el CI recibe una fuerte proyección directa excitatoria y glutamatérgica de la corteza auditiva (Jones and Rockel, 1973, Mitani et al., 1983, Feliciano and Potashner, 1995, Saldaña et al., 1996) e indirecta por vía del tálamo. Las proyecciones descendentes desde la corteza auditiva primaria son un mecanismo de control tanto de las regiones de integración como del *core* en el CI (Saldaña et al., 1996). Cualquier lesión en dicha corteza alterará el balance excitación-inhibición dentro del colículo, lo que provocará cambios en los elementos pre- y post-sinápticos del mismo para intentar compensar ese desequilibrio.

De acuerdo con Bassani et al (Bassani et al., 2009) las sinapsis excitatorias del sistema nervioso central de los mamíferos son sitios de contacto neurona-neurona asimétricos que permiten la formación de redes neuronales dentro del cerebro. Los receptores AMPA son receptores ionotrópicos de glutamato que se concentran principalmente en los sitios postsinápticos de las sinapsis excitatorias. Intervienen en la mayoría de las transmisiones sinápticas excitatorias rápidas en el sistema nervioso central de vertebrados, y juegan un papel importante en muchas funciones diferentes del cerebro tales como el aprendizaje y la memoria.

Los receptores AMPA están formados por combinaciones heteroméricas de cuatro subunidades (GluR1-GluR4, también llamadas GluRA-D) (Hollmann and Heinemann, 1994). Estas combinaciones dan lugar a subtipos de receptores específicos con distintas propiedades de canal (Rosenmund et al., 1998). De entre todas las combinaciones, la que se observa que es más abundante (en un 70%) en la corteza adulta es GluR1/GluR2. Aunque en el cerebro también podemos encontrar regiones que expresan GluR3 (Moga et al., 2002) y GluR4 (Zhu et al., 2000) que se combinan con GluR2.

Ankyring-repeat Rich Membrane Spanning (ARMS), también llamada Kidins220, es una proteína altamente expresada en el sistema nervioso (Cortes et al., 2007) que sirve como sustrato de fosforilación inducida por efrinas y neurotrofinas (Kong et al., 2001, Arevalo et al., 2004, Arevalo et al., 2006). La presencia en su estructura de dominios de interacción proteína-proteína hace que ARMS sea un buen candidato para tener funciones de andamiaje o anclaje de otras proteínas. Investigaciones

recientes (Arevalo et al., cp), muestran que ARMS se comporta como un factor de retención que regula la expresión en la superficie celular de GluR1. Según estos autores, ARMS puede regular la función de los receptores AMPA restringiendo la localización de GluR1.

La Sinaptotagmina presenta diferentes isoformas, pero nos vamos a centrar en la sinaptotagmina I, una proteína vesicular ligadora de calcio. En cuanto a su función, hemos de distinguir dos aspectos. Por un lado, a altas concentraciones de Ca^{2+} está unida a la tubulina de los microtúbulos, a través de una interacción que amarra a las vesículas al citoesqueleto (Honda et al., 2002). Por otro, parece regular los eventos de exocitosis en concentraciones micromolares bajas de Ca^{2+} (Geppert and Sudhof, 1998) y más recientemente Xu J et al., (Xu J, 2009). Se cree que el dominio C_2B es el que mediaría la unión simultánea de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática a través de sus lazos de unión al Ca^{2+} y los abundantes residuos básicos alrededor de su superficie. Así pues, a altas concentraciones de Ca^{2+} funciona como una proteína que retiene a las vesículas dentro del terminal presináptico, a través de la unión de las mismas al citoesqueleto; pero las bajas concentraciones de Ca^{2+} harían que dicha unión no se mantuviera, y favorecerían la exocitosis de las vesículas.

La sinaptofisina es una glicoproteína ácida que se une al Ca^{2+} , homooligomérica (monómeros de 38 KDa) e integrante de la membrana de las vesículas presinápticas. La función que tiene esta proteína en el ciclo vital de las vesículas presinápticas es incierta, pero parece que regula la disponibilidad de las mismas interviniendo en la endocitosis o en otros pasos de reciclaje subsecuentes (Evans and Cousin, 2005). Por ello, la tendencia de las líneas de investigación actuales (Deshpande et al., 2009, Xian et al., 2009) es utilizar a la sinaptofisina como marcador presináptico, para observar las variaciones en los niveles de las vesículas presinápticas.

La ablación cortical parcial como consecuencia de la pérdida de la proyección descendente excitatoria provoca una alteración del equilibrio entre excitación e inhibición en el CI, e induce cambios en la actividad neuronal y ante todo en el ritmo de descarga de sus neuronas (Popelar et al., 2003). Con este trabajo, nos proponemos observar desde el punto de vista de la proteómica las variaciones que se producen en el CI como consecuencia de la destrucción parcial de la proyección descendente de la

corteza auditiva primaria hacia el colículo inferior. Estos cambios deben tener un reflejo en las proteínas presinápticas vinculadas tanto al transporte y liberación de vesículas de neurotransmisor, como a los receptores postsinápticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para el experimento se usaron 6 ratas Wistar macho de unos 230 g de peso. Los animales se mantuvieron en una habitación con ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a temperatura ambiente, y en jaulas individuales, con libre acceso tanto a la comida como a la bebida. Se tuvieron así durante una semana, para que se adaptasen a las condiciones del laboratorio antes de la cirugía.

Los 6 animales se distribuyeron en dos grupos experimentales: un grupo 1 o control ($n = 3$), y un grupo 2, de 15 días post-lesión ($n = 3$).

Lesiones y extracción del colículo inferior

Cada rata fue anestesiada intramuscularmente con una dosis de 1 ml/Kg_{peso} de una mezcla formada por sulfato de ketamina (Imalgène 1000- Merial) y xilacina (Rompun 2% - Bayer) en proporción 4:3. Se le afeitó el pelo de la cabeza y se la colocó en el aparato estereotáxico. Se realizaron lesiones unilaterales en el lado izquierdo de la cabeza, siguiendo las coordenadas de Paxinos y Watson, para eliminar la corteza auditiva primaria. Para ello, con la ayuda de una lupa, se abrió en el cráneo una ventana de aproximadamente 3x3 mm y, por aspiración, se eliminó la corteza auditiva primaria. Se rellenó la cavidad con surgicel y se suturó la piel. Acabada la cirugía, el animal fue devuelto a su jaula.

Al cabo de 15 días, se sacrificaron los animales del grupo 2, con sobredosis de pentobarbital sódico seguida por decapitación, y se extrajo de ellos el CI. Se separó el CI izquierdo y el derecho, se homogeneizó el tejido con una

cuchilla y se colocó en *ependorffs* diferentes. Los *ependorffs* con las muestras se congelaron a -20° C.

Los animales del grupo control sufrieron toda la cirugía a excepción del proceso de absorción de la corteza auditiva primaria. Y al igual que los animales del otro grupo, se sacrificaron y se extrajo de ellos el CI.

Preparación de las muestras para *Western Blot*

Tras ser descongeladas, a las muestras de CI se les añadió un tampón de lisis (137 mM ClNa, 20 mM Tris-ClH pH=8, 10% glicerol, 1% NP-40, 0.2% SDS, 2 mM EDTA) y una mezcla de inhibidores de proteasas (0.15 U/ml aprotinina, 20 µM leupeptina, 1mM PMSF), y además 1 mM ortovanadato sódico, antes de cada experimento, para conseguir lisar al máximo el tejido. Después se mantuvieron 45 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 13000 rpm. Del sobrenadante se cuantificaron las proteínas siguiendo el método de Bradford, para el que se utilizó el producto Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-rad laboratories) y se empleó BSA para hacer la recta patrón. Los valores que se obtuvieron se encontraban dentro de dicha recta.

Western Blot

Se llevó a cabo un Western Blot para determinar GluR1, GluR2, Sinaptofisina, Sinaptotagmina I y ARMS. El procedimiento llevado a cabo es el siguiente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

A las muestras se les añadió un volumen de tampón de carga concentrado 2X (20 mM DTT, 4% SDS, 20% glicerol, 0.02% azul de bromofenol en 125 mM Tris-ClH pH 6.8), se hirvieron durante 5 minutos y se clarificaron por centrifugación a 13000xg 5 minutos. El sobrenadante se resolvió por electroforesis en una cubeta Mini-Protean[®]II(BioRad), siguiendo el método

de electroforesis discontinua descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La composición de los geles se basó en las mezclas para SDS-PAGE descritas por Harlow y Lane (Harlow et al., 1988) y la concentración de acrilamida de los geles fue del 8%.

Transferencia de proteínas a PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon™-P 0.45 µm, Millipore) en una cubeta Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad), según el método de Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). Se utilizó como tampón de transferencia 10 mM CAPS (Sigma) en 10% Metanol, pH 11.

Detección por la técnica de Western de proteínas desnaturalizadas

Para este análisis hemos empleado el método "*ECL Western blotting detection system*" (Amersham), siguiendo las especificaciones técnicas sugeridas por esta compañía. El tampón empleado en las incubaciones y lavados fue TBST (TBS con 0.1% de Tween 20). El bloqueo de las membranas se ha llevado a cabo mediante incubación en una solución de TBST con 3% (peso/volumen) de seroalbúmina bovina (BSA, Fraction V; Sigma, Ref. A-9647). Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-GluR1 (conejo), anti-GluR2 (conejo), anti-sinaptotagmina I (ratón), anti-sinaptofisina (ratón) y anti-tubulina, que se utilizó como control de carga de las muestras. Se utilizaron los anticuerpos secundarios apropiados (*anti-IgG* de conejo o *anti-IgG* de ratón) unidos a peroxidasa (Amersham), para la detección quimioluminiscente posterior.

El revelado se llevó a cabo con películas de la casa Fujifilm (Fuji Medical X-RAY FILM 100 NIF 18x24).

Densitometría

Las películas fotográficas con las bandas resultantes del *western* fueron escaneadas para obtener una imagen digital. A continuación, con el programa ImageJ 1.64, se analizó sobre esa imagen digital el nivel de gris resultante para cada una de las bandas de cada proteína. Se escogió un cuadrado de 18x10 unidades y se posicionó sobre cada una de las bandas para obtener el valor medio, la desviación estándar, el máximo y el mínimo de grises que las componían. El mismo cuadrado se posicionó también sobre 3 zonas elegidas al azar, próximas a las bandas pero sin incluirlas, para obtener también datos del nivel de gris del fondo, y así poder después normalizar el valor medio del nivel de gris de las bandas con un método previamente utilizado en nuestro laboratorio (Riquelme et al., 2001)

RESULTADOS

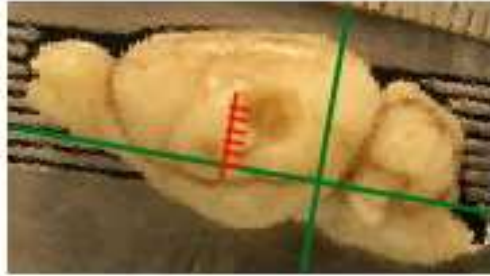
Lesiones corticales

Las lesiones sobre la corteza auditiva (Figura 3) se llevaron a cabo según las coordenadas tomadas del atlas de Paxinos y Watson.

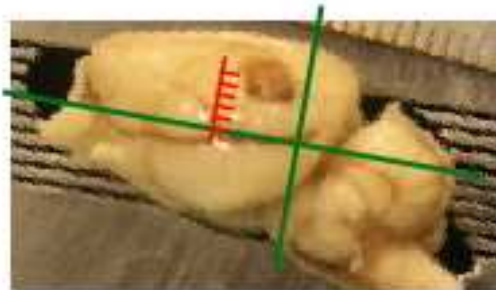
Western Blot

En el grupo de 15 días post-lesión, los resultados obtenidos en el *Western Blot* (Figura 4) muestran para GluR1 y GluR2 unas bandas más tenues que las del grupo control en los animales 08-247 y 08-249. En el animal 08-250 las bandas para GluR1 y GluR2 son semejantes a las de los controles.

08-247



08-249



08-250

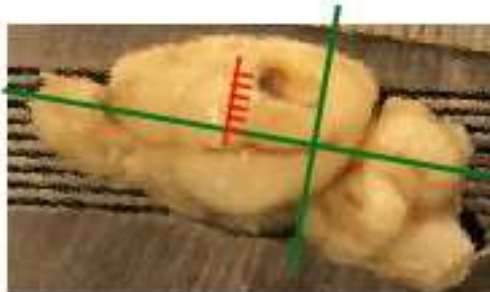


Figura 3. Imágenes de las lesiones en la corteza auditiva de los animales del grupo experimental. Sobre las imágenes se han colocado unos ejes imaginarios (en verde) que delimitan la Fisura Rinal (en horizontal) y la Interaural 0 (en vertical). Sobre el eje de la Fisura Rinal se ha colocado una escala (en rojo) en milímetros que indica la distancia a la que se encuentran las lesiones con respecto a la Fisura Rinal. En todos los casos éstas comienzan a los 3 mm de distancia, y acaban sobre los 5mm.

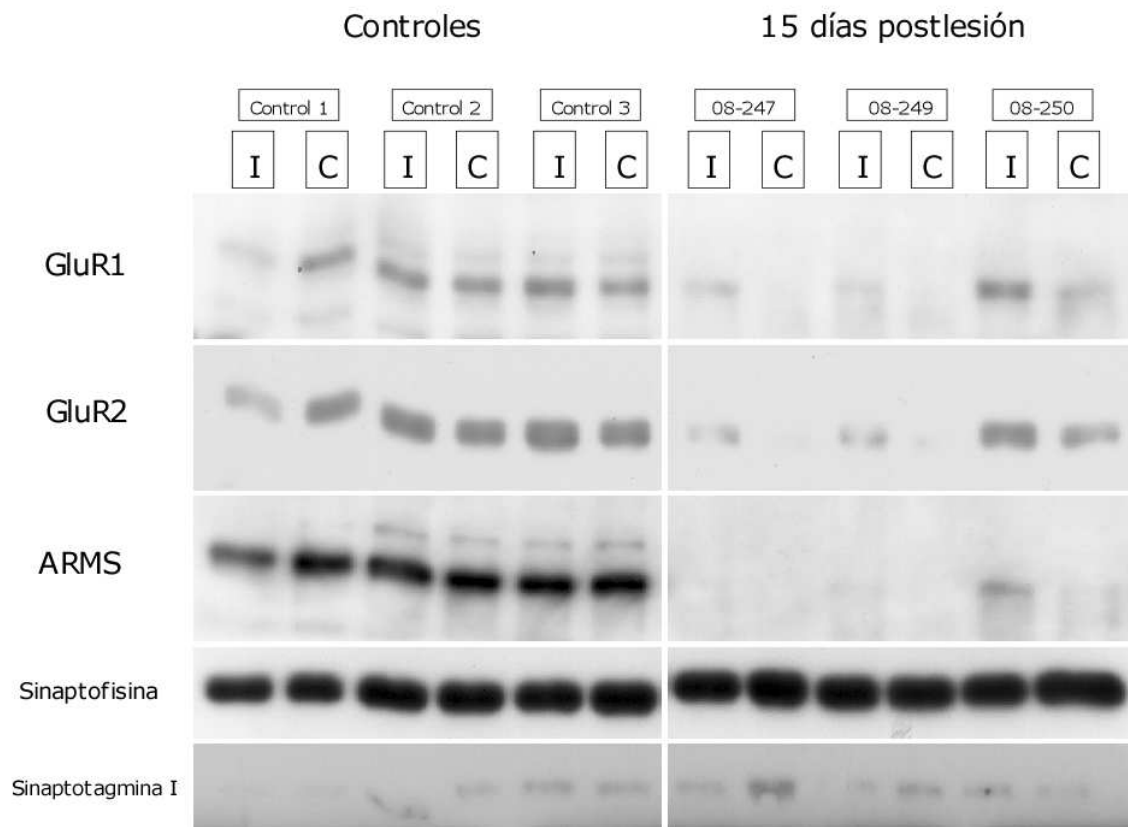


Figura 4. Western Blot para GluR1, GluR2, ARMS, Sinaptofisina y Sinaptotagmina I. Los resultados para los animales control están a la izquierda de la figura, y los de 15 días post-lesión están a la derecha. I= CI ipsilateral a la lesión. C= CI contralateral a la lesión.

En el caso de ARMS, las bandas son muy tenues para 08-250 con respecto al grupo control. Y desaparecen para los otros dos animales.

La Sinaptofisina está presente en los animales de los dos grupos. Y las intensidades de banda para todos los casos son semejantes. Sin embargo, las bandas para la Sinaptotagmina I se aprecian poco en los dos grupos.

Densitometría

En los animales lesionados 08-247 y 08-249, los valores de gris normalizados (Figura 5) correspondientes para GluR1, GluR2 y ARMS muestran una disminución en la cantidad de estas proteínas con respecto a los animales control. Dicha disminución se da tanto en el CI ipsilateral como en el contralateral.

En el caso 08-250, los datos obtenidos para GluR1 en el CI ipsilateral a la lesión están por encima de los de los controles, y los del CI contralateral a la lesión están por debajo, pero no disminuyen tanto como en los otros casos del grupo de 15 días post-lesión. Los datos obtenidos para ARMS y GluR2 en este mismo animal 08-250, están por debajo de los obtenidos para los controles, pero no disminuyen tanto como lo hacen los datos de 08-247 y 08-249.

Los valores de gris normalizados para la Sinaptofisina muestran un aumento leve de la misma en los animales lesionados con respecto al grupo control.

Los valores de gris normalizados para la Sinaptotagmina I aumentan en los animales lesionados con respecto al grupo control.

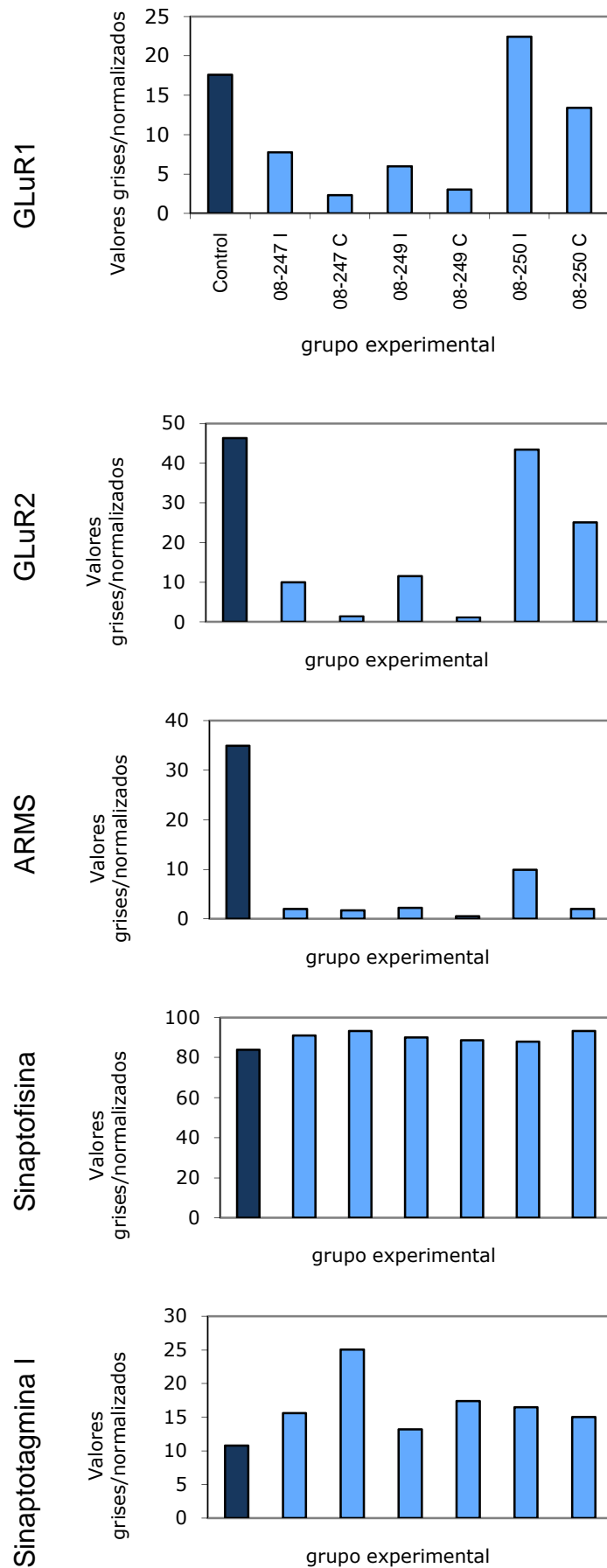


Figura 5.

Representación gráfica de los valores de gris normalizados para GluR1, GluR2, ARMS, sinaptofisina, sinaptotagmina I frente al grupo experimental. En cada gráfica, la primera columna (azul oscuro) corresponde al CI del grupo control. El resto de columnas (azul claro) corresponden al CI ipsi o contralateral de los animales lesionados.

DISCUSIÓN

En 1998, Carlton et al. (Carlton et al., 1998) demostraron que tras una axotomía dorsal de la médula espinal disminuía la cantidad de inmunotinción para GluR1 en las laminas III y V y en la región reticulada de la lámina V del asta dorsal. No son los únicos que han hecho una demostración semejante, pues hay muchos trabajos acerca de los cambios que experimentan las subunidades de los receptores ionotrópicos del glutamato en diversas regiones del cerebro tras ablaciones corticales o daños neurales (Wullner et al., 1994, Kopniczky et al., 2005, Mowery and Garraghty, 2009).

En nuestro estudio, la ablación de la corteza auditiva primaria hace que disminuya la cantidad de GluR1 y GluR2 en el CI de los animales 08-247 y 08-249 pero no en 08-250. La disminución de GluR1 y GluR2 observada en 08-247 y 08-249, ocurre tanto en el CI ipsi- como en el contralateral a la lesión. El hecho de que aparezca una cantidad baja de receptores AMPA en el CI contralateral puede deberse al desequilibrio excitación-inhibición que se crea dentro del CI al eliminar la proyección córtico-colicular. Lo que creemos que ocurre en 08-250 es que la lesión es más dorsal y se afectan menores cantidades de cortezas auditivas (Figura 3).

Los estudios de Wüllner et al. (Wullner et al., 1994) demostraron que la ablación de la corteza frontal unilateral produce cambios en la expresión de los genes que codifican las subunidades de los receptores AMPA en el estriado, una diana glutamatérgica de la corteza frontal. Como los datos de estos autores coinciden con los datos procedentes de nuestro estudio, es posible que existan cambios en la biosíntesis de estas subunidades en nuestro sistema.

En los casos 08-247 y 08-249, la cantidad de ARMS, una proteína que regula la función de los receptores AMPA restringiendo la localización de GluR1 en la membrana post-sináptica (Arevalo et al., cp) también está disminuida. Pensamos que estos datos podrían indicar que en el elemento post-sináptico el número de receptores AMPA está disminuido, y que éstos no son plenamente funcionales. Pero para poder confirmar esto hacen falta estudios con otras proteínas que unan GluR1, u otras subunidades de los receptores AMPA, a la membrana para compararlos con lo obtenido con ARMS.

Las variaciones en Sinaptofisina tras lesión han sido estudiadas por Fuentes-Santamaría et al. (Fuentes-Santamaría et al., 2005, Fuentes-Santamaría et al., 2007), en el sistema auditivo, y por Krassioukov y Weaver (Krassioukov and Weaver, 1996) en la médula espinal. Ambos grupos demostraron que las lesiones que llevaban a cabo producían aumentos en la Sinaptofisina en las regiones que estudiaban. En nuestro trabajo, el aumento en sinaptofisina en los animales lesionados con respecto al control es leve, y asumimos que no es relevante. Sin embargo, el que las cantidades de Sinaptofisina no estén disminuidas y sean semejantes las de los animales lesionados y las de los controles, podría deberse a: 1) la pérdida del input cortical es restaurada con el tiempo por un fenómeno de *collateral sprouting*, y 2) una upregulation en la concentración de las vesículas sinápticas contenidas en cada terminal (Fuentes-Santamaria et al., 2007).

Los cambios en sinaptotagmina tras deaferentación ya fueron estudiados por Greif KF (Greif, 1986) en el ganglio cervical superior en 1986. El trabajo de este autor demostraba que los niveles de sinaptotagmina aumentaban a pocos días después de la lesión pero que tendía a regresar a los valores controles con el tiempo. En nuestro trabajo, 15 días después de la ablación de la corteza auditiva primaria también observamos en el CI un aumento en la sinaptotagmina I con respecto al control, tanto en el colículo ipsi- como en el contralateral. A la vista de los resultados de Greif KF (Greif, 1986), podríamos pensar que estos niveles de sinaptotagmina con el tiempo recuperarán sus valores controles, pero deben realizarse más experimentos para poder confirmar esto.

Tomados juntos, los resultados obtenidos para GluR1, GluR2, ARMS, sinaptofisina y sinaptotagmina I tras ablación de la corteza auditiva parecen indicar que, 15 días después de la lesión, la funcionalidad de las sinapsis en el colículo inferior podría estar afectada. Pero son necesarios más estudios para poder confirmarlo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de Miguel Ángel Merchán Cifuentes, Cheryl Clarkson Paredes, Ignacio Plaza López y Juan Carlos Arévalo. Agradezco a la Obra Social de Caja España la concesión de una de sus becas para realizar el "Máster en Neurociencias" en el que presento este proyecto. Y finalmente doy gracias a Leila, Judith, José Alberto, Vicente y Gloria por todo el apoyo que me han dado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arevalo, J. C. ; Takahashi, T. ; Wu, S. H. ; Chao, M. V. (Retention of GluR1 receptors by ARMS/Kidins220 protein results in changes in synaptic activity: PS3-29. cp)
- Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV (Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281:1001-1007.2006).
- Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *The EMBO journal* 23:2358-2368.2004).
- Bassani S, Valnegri P, Beretta F, Passafaro M (The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience* 158:55-61.2009).
- Brodal P, Brodal A (The olivocerebellar projection in the monkey. Experimental studies with the method of retrograde tracing of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology* 201:375-393.1981).
- Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE (Plasticity in alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor subunits in the rat dorsal horn following deafferentation. *Neuroscience letters* 242:21-24.1998).
- Cortes RY, Arevalo JC, Magby JP, Chao MV, Plummer MR (Developmental and activity-dependent regulation of ARMS/Kidins220 in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental neurobiology* 67:1687-1698.2007).
- Deshpande A, Kawai H, Metherate R, Glabe CG, Busciglio J (A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci* 29:4004-4015.2009).
- Evans GJ, Cousin MA (Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society transactions* 33:1350-1353.2005).
- Feliciano M, Potashner SJ (Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. *Journal of neurochemistry* 65:1348-1357.1995).
- Fuentes-Santamaría V, Alvarado JC, Henkel CK, Brunso-Bechtold JK (Cochlear ablation in adult ferrets results in changes in insulin-like growth factor-1 and synaptophysin immunostaining in the cochlear nucleus. *Neuroscience* 148:1033-1047.2007).
- Fuentes-Santamaría V, Alvarado JC, Taylor AR, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (Quantitative changes in calretinin immunostaining in the cochlear nuclei after unilateral cochlear removal in young ferrets. *The Journal of comparative neurology* 483:458-475.2005).

- Geppert M, Sudhof TC (RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annual review of neuroscience* 21:75-95.1998).
- Greif KF (Plasticity of expression of a synaptic vesicle antigen in adult rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 6:3628-3633.1986).
- Harlow P, Litwin S, Nemer M (Synonymous nucleotide substitution rates of beta-tubulin and histone genes conform to high overall genomic rates in rodents but not in sea urchins. *Journal of molecular evolution* 27:56-64.1988).
- Hollmann M, Heinemann S (Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* 17:31-108.1994).
- Honda A, Yamada M, Saisu H, Takahashi H, Mori KJ, Abe T (Direct, Ca²⁺-dependent interaction between tubulin and synaptotagmin I: a possible mechanism for attaching synaptic vesicles to microtubules. *The Journal of biological chemistry* 277:20234-20242.2002).
- Jones EG, Rockel AJ (Observations on complex vesicles, neurofilamentous hyperplasia and increased electron density during terminal degeneration in the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 147:93-118.1973).
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV (An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21:176-185.2001).
- Kopniczky Z, Dobo E, Borbely S, Vilagi I, Detari L, Krisztin-Peva B, Bagosi A, Molnar E, Mihaly A (Lateral entorhinal cortex lesions rearrange afferents, glutamate receptors, increase seizure latency and suppress seizure-induced c-fos expression in the hippocampus of adult rat. *Journal of neurochemistry* 95:111-124.2005).
- Krassioukov AV, Weaver LC (Morphological changes in sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 70:211-225.1996).
- Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.1970).
- Malmierca MS, Hernandez O, Falconi A, Lopez-Poveda EA, Merchan M, Rees A (The commissure of the inferior colliculus shapes frequency response areas in rat: an in vivo study using reversible blockade with microinjection of kynurenic acid. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung* 153:522-529.2003).
- Malmierca MS, Hernandez O, Rees A (Intercollicular commissural projections modulate neuronal responses in the inferior colliculus. *The European journal of neuroscience* 21:2701-2710.2005).
- Mitani A, Shimokouchi M, Nomura S (Effects of stimulation of the primary auditory cortex upon colliculogeniculate neurons in the inferior colliculus of the cat. *Neuroscience letters* 42:185-189.1983).
- Moga D, Hof PR, Vissavajhala P, Moran TM, Morrison JH (Parvalbumin-containing interneurons in rat hippocampus have an AMPA receptor profile suggestive of vulnerability to excitotoxicity. *J Chem Neuroanat* 23:249-253.2002).
- Mowery TM, Garraghty PE (Nerve-Injury Induced Changes to GluR1 and GluR2/3 Sub-unit Expression in Area 3b of Adult Squirrel Monkeys: Developmental Recapitulation? *Frontiers in systems neuroscience* 3:1.2009).
- Popelar J, Nwabueze-Ogbo FC, Syka J (Changes in neuronal activity of the inferior colliculus in rat after temporal inactivation of the auditory cortex. *Physiol Res* 52:615-628.2003).
- Riquelme R, Saldana E, Osen KK, Ottersen OP, Merchan MA (Colocalization of GABA and glycine in the ventral nucleus of the lateral lemniscus in rat: an in situ hybridization and semiquantitative immunocytochemical study. *The Journal of comparative neurology* 432:409-424.2001).

- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* (New York, NY 280:1596-1599.1998).
- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *The Journal of comparative neurology* 371:15-40.1996).
- Saldaña E, Merchan MA (Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *The Journal of comparative neurology* 319:417-437.1992).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.1979).
- Wullner U, Standaert DG, Testa CM, Landwehrmeyer GB, Catania MV, Penney JB, Jr., Young AB (Glutamate receptor expression in rat striatum: effect of deafferentation. *Brain research* 647:209-219.1994).
- Xian X, Liu T, Yu J, Wang Y, Miao Y, Zhang J, Yu Y, Ross C, Karasinska JM, Hayden MR, Liu G, Chui D (Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice. *J Neurosci* 29:4681-4685.2009).
- Xu J PZ, Shin OH, Südhof TC (Synaptotagmin-1 functions as a Ca (2+) sensor for spontaneous release. *Nature neuroscience*.2009).
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.2000).
- Xu J, Pang ZP, Shin OH, Südhof TC. (Synaptotagmin-1 functions as a Ca(2+) sensor for spontaneous release). *Nat Neurosci*. 2009 May 3. [Epub ahead of print]